

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT/JP 98/02648

日本特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

30.06.98

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1997年 6月18日

REC'D 21 AUG 1998

WIPO

PCT

出願番号
Application Number:

平成 9年特許願第160945号

出願人
Applicant(s):

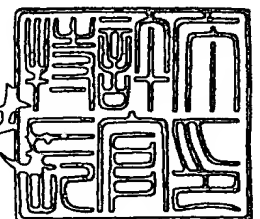
株式会社コスモ総合研究所
コスモ石油株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1998年 8月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

山佐平



出証番号 出証特平10-3062435

特平 9-160945

【書類名】 特許願

【整理番号】 P0263906

【提出日】 平成 9年 6月18日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明の名称】 悪性腫瘍診断剤及び治療剤

【請求項の数】 2

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県幸手市権現堂 1 1 3 4 - 2 株式会社コスモ総合
研究所研究開発センター内

【氏名】 田中 徹

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区西新橋 3 - 2 5 - 8 東京慈恵会医科大学内

【氏名】 佐々木 寛

【特許出願人】

【識別番号】 000130189

【氏名又は名称】 株式会社コスモ総合研究所

【特許出願人】

【識別番号】 000105567

【氏名又は名称】 コスモ石油株式会社

【代理人】

【識別番号】 100068700

【弁理士】

【氏名又は名称】 有賀 三幸

【選任した代理人】

【識別番号】 100077562

【弁理士】

【氏名又は名称】 高野 登志雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100096736

【弁理士】

【氏名又は名称】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100101317

【弁理士】

【氏名又は名称】 的場 ひろみ

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011752

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9006832

【包括委任状番号】 9006831

【包括委任状番号】 9006830

【包括委任状番号】 9206973

【包括委任状番号】 9006742

【包括委任状番号】 9006741

【包括委任状番号】 9006740

【包括委任状番号】 9206970

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 悪性腫瘍診断剤及び治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 5-アミノレブリン酸の1以上の炭素原子が炭素同位体であるか若しくはアミノ基の窒素原子が窒素同位体である化合物、又は該化合物のエステル、アミド、若しくは塩を有効成分とする悪性腫瘍診断剤。

【請求項2】 5-アミノレブリン酸の1以上の炭素原子が炭素同位体であるか若しくはアミノ基の窒素原子が窒素同位体である化合物、又は該化合物のエステル、アミド若しくは塩を有効成分とする光動力学的悪性腫瘍治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、同位体置換された化合物を用いる悪性腫瘍診断用薬剤及び光動力学的悪性腫瘍治療剤に関する。

【0002】

【従来技術】

多くの感染症が克服された現代において悪性腫瘍は人類が直面している最大の疾病の一つである。悪性腫瘍の治療方法が次々に提案されており、治癒率も向上してきたが、悪性腫瘍を治療する上で最も大切なのは悪性腫瘍を早期に発見することであるといわれている。このため悪性腫瘍の早期発見のために各種のガンマーカーが提案されており、すでに様々な診断薬が発売されているが、その有効性には問題が残されており、また、ガンマーカーの値が高ければ悪性腫瘍の疑いが高いと言うものの悪性腫瘍が存在する位置については何の情報も得られない。

【0003】

最近、ヘマトポルフィリンやその誘導体（いわゆるポルフィリン類）が悪性腫瘍に特異的に集積することが知られ、更に、これらの化合物が光照射により蛍光を発する事からこの性質を利用した悪性腫瘍の診断方法も開発された。これらポルフィリン類のうち代表的な化合物であるフォトフリンは光照射により活性酸素を発生し悪性腫瘍を破壊することが知られており、悪性腫瘍の治療薬として認可

され、これを用いた治療は光動力学的治療として注目されている（ポルフィリン・ヘムの生命科学、ポルフィリン研究会編、東京化学同人（1995））。

【0004】

1994年に入って、5-アミノレブリン酸を投与すると誘導されるプロトポルフィリンIXが腫瘍に集積してポルフィリン類と同様な効果をもつことが見出され、上記ポルフィリン類に比べて毒性や光毒性が低く体内での代謝も早いことから注目されている。そして、このことを応用し、5-アミノレブリン酸の一部の水素を重水素（D）で置換し、MRI（磁気共鳴画像）用造影剤として用いるという報告がある（WO97/03042）。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、この造影剤を用いたMRIは、感度が必ずしも十分ではなかった。

従って、本発明の目的は、悪性腫瘍に良好に集積し、核磁気共鳴法を用いて感度よく、腫瘍の位置を特定し得る診断剤及び光動力学的悪性腫瘍治療剤を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】

斯かる実情に鑑み本発明者は5-アミノレブリン酸の代謝やポルフィリン類の性質等について鋭意研究を行った結果、5-アミノレブリン酸の炭素原子又は窒素原子をそれらの同位体で置換した化合物を用いれば、前記重水素置換化合物に比べて感度よく悪性腫瘍を検出できること、更にこの同位体置換化合物は非置換体と同等の光動力学的な悪性腫瘍の治療効果を有することを見出し本発明を完成した。

【0007】

すなわち本発明は、5-アミノレブリン酸の1以上の炭素原子が炭素同位体であるか若しくはアミノ基の窒素原子が窒素同位体である化合物、又は該化合物のエステル、アミド若しくは塩を有効成分とする悪性腫瘍診断剤、並びに光動力学的悪性腫瘍治療剤を提供するものである。

【0008】

【発明の実施の形態】

5-アミノレブリン酸を用いれば、そのままでも、核磁気共鳴法を利用して、これが全く投与されない場合に比べれば感度よく悪性腫瘍が検出できる。しかし、5-アミノレブリン酸の炭素原子や窒素原子をその同位体に置換した化合物を用いれば、更に感度よく悪性腫瘍が検出される。

【0009】

本発明において、炭素同位体としては ^{13}C 、 ^{14}C が挙げられるが、 ^{13}C が被爆のおそれがなく、安定性に優れるためより好ましい。また窒素同位体としては、 ^{13}N 、 ^{15}N が挙げられるが、同様の理由で ^{15}N が好ましい。

【0010】

炭素同位体として ^{13}C を用いた化合物としては、5-アミノレブリン酸の炭素のうち、2、3、4、5位のうちのいずれか一つ若しくは二つ以上の炭素が ^{13}C に置換された5-アミノレブリン酸が挙げられる。

この化合物を用いた場合には ^{13}C -NMRを測定することにより高感度での悪性腫瘍の診断が可能である。天然界における ^{13}C の存在比は小さいため悪性腫瘍は正のシグナルとして検出される。 ^{13}C -NMRの原理を用いた画像診断装置を用いれば画像診断が容易なことは言うまでもない。

【0011】

また、窒素同位体で置換された5-アミノレブリン酸としては、5-アミノレブリン酸のアミノ基の窒素が ^{15}N である5-アミノレブリン酸が挙げられる。

この化合物を用いた場合には ^{15}N -NMRを測定することにより高感度での悪性腫瘍の診断が可能である。天然界における ^{15}N の存在比は小さいため悪性腫瘍は正のシグナルとして検出される。 ^{15}N -NMRの原理を用いた画像診断装置を用いれば画像診断が容易なことは言うまでもない。

【0012】

また、上記 ^{13}C 置換体と ^{15}N 置換体とを組み合わせ、炭素同位体と窒素同位体の両方を含む5-アミノレブリン酸を用い、複数のNMRを測定することにより、更に正確な診断を行うこともできる。

【0013】

なお、5-アミノレブリン酸の水素のうち、2、3、5位の水素、アミノ基の水素のうちの1つもしくは2つ以上の水素が重水素 (^2H 又はD) である5-アミノレブリン酸を用いた場合でもH-NMRを測定することにより悪性腫瘍の診断が可能である。しかしながら重水素がプロトポルフィリンに取り込まれる率は、炭素原子や窒素原子よりも少ない。

また、 ^3H (T) や ^{14}C 等の放射性の同位体を含む場合はオートラジオグラフィとの組み合わせも可能であり、研究目的には極めて有効であるが人体に使用する場合は内部被爆の影響を考慮する必要がある。更に、5-アミノレブリン酸が含有するカルボン酸上の酸素の同位体についても同様の応用が可能であるが5-アミノレブリン酸のカルボン酸の酸素原子がプロトポルフィリンIXに残存する確率は25%と他の原子の場合より小さい。

【0014】

参考のため、5-アミノレブリン酸のそれぞれの原子がプロトポルフィリンIXに残存する確率と5-アミノレブリン酸から誘導されたプロトポルフィリンの原子比を表1に示す。

【0015】

【表1】

構 造	残 存 確 率			原 子 比		
	炭 素	窒 素	水 素	炭 素	窒 素	水 素
$^1\text{COOH}$	1/4	—	0*	2/34	—	0*
$^2\text{CH}_2$	1	—	1	8/34	—	4/32
$^3\text{CH}_2$	1	—	3/8	8/34	—	3/64
$^4\text{C=O}$	1	—	—	8/34	—	—
$^5\text{CH}_2$	1	—	1/2	8/34	—	2/32
NH_2	—	1/2	1/4	—	1	1/32

*: 交換反応のため実質上は0となる。

【0016】

表の残存確率が高い方が利用効率がよく、原子比が高い方が測定時の感度が高い。複数の同位体が置換している化合物の原子比は加算によって求められる。表中の値はそれぞれ原子1個当たりの値である。

【0017】

表1から明らかなように、本発明に用いる炭素同位体又は窒素同位体置換5-アミノレブリン酸は、重水素置換体に比べて測定感度が高い。

【0018】

本発明に用いる同位体置換された5-アミノレブリン酸は、自体公知の方法で製造することができるが、同位体置換されたグリシンを5-アミノレブリン酸産生微生物又はこの微生物由来の酵素に作用させて製造するのが好ましい。

【0019】

原料同位体置換グリシンとしては、メチレン基の炭素原子が ^{13}C であるもの、窒素原子が ^{15}N であるものが好ましい。これら原料同位体置換グリシンは、1カ所が同位体で置換されていても良いし、複数の箇所が同位体で置換されていても良い。このような同位体置換グリシンは公知の方法で製造することができ、また市販品（昭光通商（株）製、Glycine- ^{15}N N15-0119、Glycine-2- ^{13}C C13-0119、Glycine-2- ^{13}C , ^{15}N M-0019；アルドリッチ社製、Glycine- ^{15}N 29, 929-4、Glycine-2- ^{13}C 27, 943-9、Glycine-2- ^{13}C , ^{15}N 29, 932-4を用いてもよい。

【0020】

ここで用いる5-アミノレブリン酸産生微生物としては、5-アミノレブリン酸の生合成にC4経路を使うものが好ましい。

このような微生物は酵母、カビ、光合成細菌、リゾビウム等多岐にわたるがこれらの微生物の中でとりわけ光合成細菌は高い5-アミノレブリン酸生産能力を有しており、特にロドスピリウム属（Rhodospirillum属）、ロドシュウドモナス属（Rhodopseudomonas属）、クロマチウム属（Chromatium属）、ロドバクター属（Rhodobacter属）、更にロドバクターセファロイデス（Rhodobacter sphaeroid

es) が高い能力を有している。

また、5-アミノレブリン酸の生産性を向上させた変異株を用いることもできる。このような変異株としては、例えば工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されたCR-520 (FERM P-14672)、CR-450 (FERM P-14085)、CR-386 (FERM P-13159)、CR-286 (FERM P-12542) 等を挙げることが出来る。

【0021】

5-アミノレブリン酸を産生する微生物を用いて目的物である同位体置換5-アミノレブリン酸を製造するには、上記微生物を前記同位体置換グリシン及びレブリン酸等の存在下培養し、その培養物から目的とする同位体置換5-アミノレブリン酸を採取すればよい。同位体置換グリシンの培地への添加量は1 mM~50 mM、特に5 mM~240 mMとすることが望ましく、レブリン酸の添加量は親株を用いる場合は10 mM~300 mM、特に20 mM~180 mMとすることが望ましく、上述の変異株を用いる場合は0.1 mM~100 mM、特に1 mM~30 mMとすることが望ましい。

【0022】

上記微生物の培養条件は、特に制限されるものではなく、例えば、上記CR-450の場合は、通常のロドバクター属の微生物と同様な条件で培養できる（特開平7-246088号公報）。すなわち、CR-450の培養条件は、特に限定されるものではなく、一般には10~40℃、好ましくは20~35℃の好気条件において培養すればよく、また、上記培地のpHは5~8、特に5.5~7.5とすることが好ましい。なお、5-アミノレブリン酸の生産時にpHが変化する場合には、水酸化ナトリウム、アンモニア、水酸化カリウム等のアルカリ溶液や塩酸、硫酸、リン酸等の酸を用いてpHを調整することが好ましい。

【0023】

また、同位体置換5-アミノレブリン酸の生産はこれらの微生物の増殖と同時に行うこともでき、菌体の増殖と独立して行うこともできる。この場合、使用する微生物は、増殖基菌体、休止菌体のいずれでもよく、そのまま同位体置換5-アミノレブリン酸の生産に使用することができるが、遠心分離等の方法により集

菌し、培地やリン酸緩衝液等の適当な溶媒に再懸濁させるなどの方法を採用することにより、菌濃度を高くして用いることもできる。

【0024】

培養物から同位体置換5-アミノレブリン酸を採取するには、培養により同位体置換5-アミノレブリン酸は菌体外に分泌されるので通常、培養液から、イオン交換樹脂を用いる等の手段により分離すればよい。

【0025】

上記以外に本発明に適用できる同位体置換5-アミノレブリン酸の生産方法としては、例えば特開平3-172191号公報、特開平6-169758号公報、特開平5-95782号公報、特開平6-141875号公報、特開平6-153915号公報、特開平8-168391号公報等に記載の方法が挙げられる。

【0026】

一方、5-アミノレブリン酸産生微生物由来の酵素を用いて同位体置換5-アミノレブリン酸を製造するには、原料として同位体置換グリシンを用いる以外は公知の方法（特開平6-169758号公報）により行うことができる。

【0027】

詳細には、例えば次の様にして同位体置換5-アミノレブリン酸を製造することができる。

まず、酵素としては、5-アミノレブリン酸産生微生物の培養物をそのまま用いるか、又は遠心分離器等で菌体分離したものをを用いる。なお、分離した菌体は、更に、リン酸緩衝液等の溶液で洗浄し、該溶液に懸濁させて使用することもできる。

また、菌体由来の酵素は、常法により精製したものを使用することが望ましい。

すなわち、例えば、上記した菌体の懸濁液を、超音波、フレンチプレス、高压ホモジナイザ等により破碎処理して得られた菌体破碎物を、遠心分離等により固液分離した後、カラム精製、電気泳動等の一般的精製手段により精製酵素としたものを使用する。

【0028】

更に、これらの休止菌体や菌体由来の酵素は、固定化すると単位体積当たりの酵素量が多くなるため、固定化したものを使用すると、効率良く反応を行うことができる。

この固定化は、アルギン酸カルシウム法、ポリアクリルアミドゲル法、ポリウレタン樹脂法、光架橋樹脂法等の常法により行うことができる。

【0029】

これらの休止菌体や菌体由来の酵素に、同位体置換グリシンとコハク酸等を、リン酸緩衝液中で接触させると、反応が生じて同位体置換5-アミノレブリン酸が製造される。

【0030】

このときの反応条件は、CR-17株の変異・分離の場合の条件（特開平6-169758号公報）と同様とするのが好ましい。なお、酵素を使用する場合は、光照射は不要である。

【0031】

この反応において、エネルギー源として、ATP（アデノシン三リン酸）、ピリドキサルリン酸、CoA（コエンザイムA）、またメタノール、エタノール、水素、ニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチド（NAD）、ホルムアルデヒド、蟻酸等の電子供与体を適宜添加するのが好ましい。

なお、この反応において、5-アミノレブリン酸デヒドラターゼの活性阻害物質を添加することができる。

以上の如くして得られた同位体置換5-アミノレブリン酸は、粗精製物をそのまま用いてもよいし、目的に応じて常法により精製してもよい。

【0032】

同位体置換5-アミノレブリン酸は、投与後、体内において、同様な作用を示す誘導体にして用いてもよい。このような化合物としては、5-アミノレブリン酸のエステル、アミド又は塩が挙げられる。このうち、エステル又はアミドとしては具体的には、例えば、5-アミノレブリン酸メチルエステル、5-アミノレブリン酸エチルエステル、5-アミノレブリン酸プロピルエステル、5-アミノ

レブリン酸ブチルエステル、5-アミノレブリン酸ペンチルエステル、5-アミノレブリン酸ヘキシルエステル、5-アミノレブリン酸ヘプチルエステル、5-アミノレブリン酸オクチルエステル、5-アミノレブリン酸ノニルエステル、5-アミノレブリン酸ドデシルエステル、5-アミノレブリン酸ヘキサデシルエステル、5-アミノレブリン酸イソプロピルエステル、5-アミノレブリン酸シクロヘキシルエステル、5-アミノレブリン酸ベンジルエステル、5-アミノレブリン酸フェネチルエステル、5-アミノレブリン酸-3-フェニルプロピルエステル、5-アミノレブリン酸エトキシエチルエステル、5-アミノレブリン酸-2-(ヒドロキシメチル)テトラフラニルエステル、5-アミノレブリン酸-2-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロピラニルエステル、5-アミノレブリン酸アセトアミド、5-アミノレブリン酸-n-ヘキサノイックアミド、5-アミノレブリン酸-n-ノナノイックアミド等が挙げられる。また塩としては、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、コハク酸塩、シュウ酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、乳酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、グリコール酸塩、メタンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩等の有機酸塩、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、アンモニウムあるいはアルキルアンモニウム塩等が挙げられる。更に、これらの同位体置換5-アミノレブリン酸、そのエステル、アミド又は塩は、水和物又は溶媒和物を形成していてもよい。これらの化合物及びその合成方法は特開平4-9360号公報に記載されている。

【0033】

本発明の悪性腫瘍診断剤及び治療剤は、上記同位体置換5-アミノレブリン酸等を有効成分とするものであり、被検体に害を及ぼさないものであれば特に剤型は限定されない。ただし、水溶液とする場合は、投与時のpHに留意することが必要である。すなわち、pHが8以上のアルカリ条件下では、有効成分が酸化的に分解するので長時間アルカリ条件下に置くことは好ましくなく、静注用の薬剤の調製等がアルカリ性とする場合は短時間で処理することが好ましい。また、やむを得ず長時間の保存が必要な場合は窒素パージなどの方法で溶液中の溶存酸素を低下させておくことが望ましい。

好ましいpHは8以下、特に7以下、更に6.1以下である。

【0034】

本発明の悪性腫瘍診断剤又は治療剤の投与方法は特に限定されず、例えば経口投与しても静脈注射により投与しても良いし、患部やその周辺に塗布して用いたエアロゾルとして吸入により投与しても良い。更に、坐薬として投与する事も可能である。

【0035】

投与量は診断に加え治療も目的とする場合は全身への投与の場合、体重1kg当たり10mg～10g、より望ましくは100mg～1g必要であるが塗布等による局所投与の場合は更に減ずることが可能である。また、診断のみを目的とする場合は投与する物質の同位体純度や測定機の感度により異なるが投与量をかなり減ずることができる。現有の機器を用い、同位体純度が100%の場合には治療の場合の1/10以下の投与量で十分である。診断時の投与量は今後の測定器の感度向上により減少させられることが予想できるが、投与量が多い場合に問題はない。ただし、治療の場合の薬量以上の投与は経済的に不利である。診断と治療を同時に行う場合は同位体を含まない5-アミノレブリン酸を添加し同位体純度を下げることによって経済的な負担を軽減することもできる。

【0036】

投与後測定、治療までの時間は投与方法や対象とする腫瘍によって若干異なるが投与後1～8時間の間でポルフィリン類の存在比が最大になることが多い。経済的にみればポルフィリン類の蓄積量は腫瘍で早く正常組織で遅い傾向がある。治療を行う場合は被検者の腫瘍の種類毎にポルフィリン類の存在比が最大になる時間を測定し、その後最大存在比となる時間において光動学的治療を行うのが最も効果的である。

光動学的治療に関しては同位体で置換されていない5-アミノレブリン酸を用いた場合と全く同じ手法を用いることができる。(C.S.Loh et al., Br. J. Cancer, 68, 41-51, (1993))。すなわち、5-アミノレブリン酸の投与で誘導され、かつ癌細胞に特異的に蓄積したポルフィリン類に光を照射することにより、癌細胞を選択的に死滅させる方法を用いることができる。

ここで、治療に用いる光照射はどのような光であっても有効であるがポルフィリンの吸収波長を含むことが望ましい。このような波長の範囲は400nm～800nmが好ましく、より好ましくは600nm～700nmである。照射する光の照度は強ければ強いほど殺癌力が強いが強すぎた場合、正常細胞にも傷害を与えるので、癌の大きさや深さに応じて照射することが肝心である。肺癌、胃癌、喉頭癌、直腸癌、大腸癌、十二指腸癌、膀胱癌等の場合は内視鏡と組み合わせてレーザー光を照射する事で手術を伴わずにPDT治療を行うことが出来る。レーザー光を用いる場合は照射時間で照射を加減することが出来る。また、ここではパルス照射も有効である。5-アミノレブリン酸及びその誘導体の投与で誘導され、癌細胞に特異的に蓄積するポルフィリン類が増感剤として働くため、光照射で正常細胞より癌細胞がより多くのダメージを受けるが、治療時にはなるべく癌細胞に多くの光が照射されるように操作することが望ましいのは当然である。レーザー光の場合は焦点が絞りやすいためこの点でも有利な光源である。

治療は1回でも良いし複数回繰り返して行うこともできる。

治療による効果が十分であったかどうかには本発明の診断剤が有効に使えることは言うまでもない。即ち、本願発明は診断剤としても治療剤としても使用しうる診断剤兼治療剤の発明と言うこともできる。

同位体置換による影響は実用上無視して良い。

【0037】

本発明診断剤を用いた診断法の原理は、5-アミノレブリン酸を投与した時に代謝物であるプロトポルフィリンIXに代表されるポルフィリン類が悪性腫瘍に集積することに基づいている。この現象が現れる理由については様々な研究機関で研究が進んでおり、悪性腫瘍においてはプロトポルフィリンIXをヘムに代謝するフェロキラーゼの活性が低いのではないかとされているが今のところはっきりとした事は解っていない。

【0038】

【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0039】

製造例 1

表2に示した組成の培地（培地1）1Lを、2Lの発酵槽に入れ、121℃で15分間滅菌し、室温に冷却した。

上記の発酵槽に、あらかじめ培地200mlを入れた1L容の坂口フラスコでしんとう培養して増殖させた光合成細菌変異株CR-520（FERM P-14672）を接種し、30℃、通気量0.1v/v/m、攪拌数200回転で培養を行った。培養開始後48時間後にグリシン-¹⁵Nを3g（Atom%-99、昭光通商（株）製、レブリン酸、グルコース、酵母エキスがそれぞれ5mM、50mM、1%になるように加え、また、pHが6.5から7になるように1N水酸化ナトリウム及び1N硫酸で調整した。更に、通気量を0.014v/v/mに減少させ窒素ガスを0.086v/v/mにて供給した。攪拌数は500回転とした。この条件で培養を84時間まで行った。培養後の5-アミノレブリン酸の濃度は2.3g/Lであった。

【0040】

得られた培養液をBiochem. J. (1984) 219, 883-889 に記載の前処理方法に基づき前処理し、2-メチル-3-アセチル-4-(3-プロピオン酸ペンタフルオロベンジルエステル)ピロールを生成せしめ、GC/MS分析により得られた¹⁴Nを有する5-アミノレブリン酸由来の136（M⁺-(C₇H₂F₅+CH₂CO₂））の分子ピークと¹⁵Nを有する5-アミノレブリン酸由来の137（M⁺-(C₇H₂F₅+CH₂CO₂））の分子ピークの比を比較し、ラベル化率を求めたところラベル化率は48%であった。

本実施例より目的通りグリシンの含有した同位体が生産された5-アミノレブリン酸に移行していることがわかる。

【0041】

【表 2】

	g/L (蒸留水)
グルコース	9. 0
グルタミン酸ナトリウム	3. 8
リン酸 1 水素カリウム	0. 5
リン酸 2 水素カリウム	0. 5
硫酸アンモニウム	1. 3
硫酸マグネシウム	0. 2
塩化マグネシウム	0. 0 5 3
硫酸マンガン	$1. 2 \times 10^{-3}$
ニコチン酸	$1. 2 \times 10^{-3}$
ビオチン	$1. 0 \times 10^{-5}$
チアミン	$1. 0 \times 10^{-3}$
酵母エキス	2. 0

【0042】

製造例 2

加えるグリシン- ^{15}N の量を 6 g とする以外は製造例 1 と同様に実施したところ生産された 5-アミノレブリン酸の濃度は 2. 6 g/L、ラベル化率は 88% であった。

本製造例より添加するラベルグリシンの濃度が高いほど得られる 5-アミノレブリン酸のラベル化率は高くなることがわかる。

【0043】

製造例 3

グリシン-2- ^{13}C を 6 g (Atom%-99、昭光通商(株)製)を用いた以外は製造例 2 と同様に実施したところ、得られた 5-アミノレブリン酸の濃度は 2. 5 g/L であり、 ^{12}C を有する 5-アミノレブリン酸由来の 136 (M^+ - ($\text{C}_7\text{H}_2\text{F}_5 + \text{CH}_2\text{CO}_2$)) の分子ピークと ^{13}C を有する 5-アミノレブリン

ン酸の137 ($M^+ - (C_7H_2F_5 + CH_2CO_2)$) の分子ピークの比により計算したラベル化率は91%であった。

【0044】

製造例4

製造例3と同様に培養した菌体をトリス塩酸バッファー (pH 8.1) で3回洗浄し、フレンチプレスにより破碎し蛋白質濃度10mg/mlの粗酵素液を調整した。これにATP 10mM、CoA-SH 1mM、ピリドキサルリン酸 1mM、スクシニルCoA 2mM、塩化マグネシウム 10mM、トリス塩酸バッファー 50mM、グルタチオン 0.3g/L、グリシン-2- ^{13}C (Atom%-99、昭光通商(株)製) を1g/Lとなるように添加し、33℃で3時間インキュベートした。インキュベート後、得られた5-アミノレブリン酸の濃度は0.18g/Lであった。製造例3と同様の方法で求めたラベル化率は98%であった。図1にその結果のNMRスペクトルを示す。

以上より酵素法によっても同位体を含む5-アミノレブリン酸が製造可能なことがわかる。この製造例からは生産量は培養法よりも低下しているがラベル化率が高いという利点がある。更に、酵素法は一般に生体よりも放射線障害に強いので放射線同位体を含む5-アミノレブリン酸の生産に有利であることが予想される。

【0045】

実施例1

(実験動物の作成)

右体側部皮下に、1匹当たり 2×10^6 個ずつヒト卵巣癌由来シスプラチン耐性培養細胞A2480CP細胞を移植し、3週間を経たヌードマウス (BALB Cnu/nuc、癌直径約8mm) を用いた。

【0046】

(^{13}C ラベル5-アミノレブリン酸水溶液の調整)

5位の炭素を ^{13}C で置換した5-アミノレブリン酸塩酸塩 (製造例4) を用いた。この、5位の炭素が ^{13}C で置換された5-アミノレブリン酸塩酸塩を25g/Lの割合で蒸留水に溶解し水酸化ナトリウムでpH7に中和した。この溶液は中

和により食塩濃度が0.88%となった。

【0047】

(投与実験及び測定)

中和した溶液を直ちに0.22 μ mのフィルターを通すことで滅菌し、体重1g当たり12 μ lの割合でマウス尾静脈より投与した。この投与量は体重1kg当たり5-アミノレブリン酸塩酸塩300mg投与に相当する。投与後2時間、4時間及び8時間後にマウスを尊殺し、瀉血後癌細胞及び大腿部を摘出し10mm ϕ のNMR試料管に同体積となるようにつめ、日本電子社製、超伝導NMR、JNM-A400により、観測周波数100.50MHz、プロトンデカップリング法を用いて ^{13}C -NMRを測定した。

測定後、90~160ppmまでのピーク面積を積算し、投与後8時間の1匹目を100とした相対値を算出した。実験は各条件2匹ずつで行った。結果を表3に示す。

【0048】

【表3】

^{13}C 面積積分値	癌細胞	大腿筋肉	相対比(癌/筋肉)
投与2時間 1匹目	19	11	1.7
投与2時間 2匹目	22	13	1.7
投与4時間 1匹目	89	18	4.9
投与4時間 2匹目	73	11	6.6
投与8時間 1匹目	100	51	2.0
投与8時間 2匹目	87	62	1.4

【0049】

表3からは筋肉に比べ癌細胞で ^{13}C の存在が高いことが明らかである。この結果から ^{13}C ラベル5-アミノレブリン酸を投与し ^{13}C -NMRで測定し ^{13}C の集積場所を調べることで悪性腫瘍の診断が可能である事が示された。本実施例は動物を用いたモデル実験であるが本実施例の結果より医療用のMRI技術と組み合

せ人間で悪性腫瘍の画像診断に応用できることは容易に類推される。

【0050】

【発明の効果】

本発明の診断薬を用いれば悪性腫瘍を効果的に診断できる。とりわけ従来からの技術では難しかった組織深部の悪性腫瘍に関しても対応可能である。また、非破壊的にしかも画像診断できる技術として画期的な悪性腫瘍診断方法への応用の途を与えるものである。更に、本発明の同位体で置換された5-アミノレブリン酸を用いれば光動力学的治療も可能である。

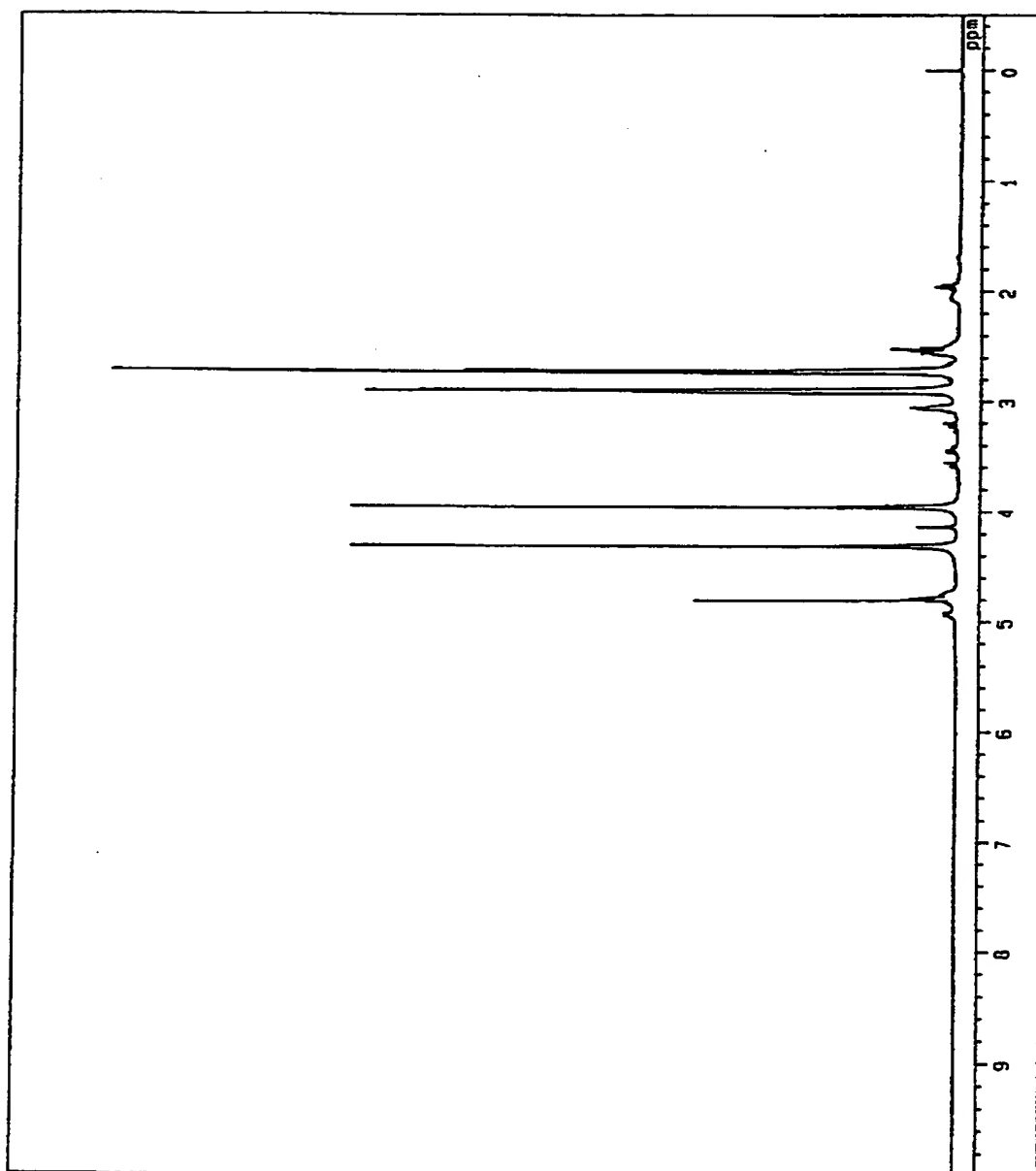
【図面の簡単な説明】

【図1】 製造例4で得た ^{13}C 置換5-アミノレブリン酸のNMRスペクトルを示す図である。

特平 9-160945

【書類名】 図面

【図1】



製造例4の ^1H -NMRスペクトル

【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 5-アミノレブリン酸の1以上の炭素原子が炭素同位体であるか若しくはアミノ基の窒素原子が窒素同位体である化合物、又は該化合物のエステル、アミド若しくは塩を有効成分とする悪性腫瘍診断剤、並びに光動力学的悪性腫瘍治療剤。

【効果】 悪性腫瘍を感度よく検出でき、また光動力学的治療ができる。

【選択図】 なし

特平 9-160945

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000130189
【住所又は居所】 東京都港区芝浦1丁目1番1号
【氏名又は名称】 株式会社コスモ総合研究所

【特許出願人】

【識別番号】 000105567
【住所又は居所】 東京都港区芝浦1丁目1番1号
【氏名又は名称】 コスモ石油株式会社

【代理人】

申請人
【識別番号】 100068700
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル
【氏名又は名称】 有賀 三幸

【選任した代理人】

【識別番号】 100077562
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル 有賀特許事務所
【氏名又は名称】 高野 登志雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100096736
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町1-3-6 共同ビル 有賀特許事務所
【氏名又は名称】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100101317
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル 有賀特許事務所
【氏名又は名称】 的場 ひろみ

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000130189]

1. 変更年月日 1990年 8月28日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都港区芝浦1丁目1番1号
氏 名 株式会社コスモ総合研究所

特平 9-160945

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000105567]

1. 変更年月日 1990年 8月28日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都港区芝浦1丁目1番1号
氏 名 コスモ石油株式会社